

현사시나무 원형질체에서 리보핵산단백질을 활용한 유전자 교정 방법 연구

박수진 · 최영임 · 장현아 · 김상규 · 최현모 · 강범창 · 이호신 · 배은경

Genome editing of hybrid poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*) protoplasts using Cas9/gRNA ribonucleoprotein

Su Jin Park · Young-Im Choi · Hyun A Jang · Sang-Gyu Kim · Hyunmo Choi · Beum-Chang Kang · Hyoshin Lee · Eun-Kyung Bae

Received: 23 November 2020 / Revised: 5 January 2021 / Accepted: 5 January 2021
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Targeted genome editing using the CRISPR/Cas9 system is a ground-breaking technology that is being widely used to produce plants with useful traits. However, for woody plants, only a few successful attempts have been reported. These successes have used *Agrobacterium*-mediated transformation, which has been reported to be very efficient at producing genetically modified trees. Nonetheless, there are unresolved problems with plasmid sequences that remain in the plant genome. In this study, we demonstrated a DNA-free genome editing technique in which purified CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins (RNPs) are delivered directly to the protoplasts of a hybrid poplar (*Populus alba* × *Populus glandulosa*). We designed three single-guide RNAs (sgRNAs) to target the stress-associated protein 1 gene (*PagSAP1*) in the hybrid poplar. Deep sequencing results showed that pre-assembled RNPs had a more efficient target mutagenesis

insertion and deletion (indel) frequency than did non-assembled RNPs. Moreover, the RNP of sgRNA3 had a significantly higher editing efficacy than those of sgRNA1 and sgRNA2. Our results suggest that the CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated transfection approach is useful for the production of transgene-free genome-edited tree plants.

Keywords CRISPR/Cas9, Hybrid poplar, *PagSAP1*, Protoplast, Ribonucleoproteins

서 언

유전자 공학 기술의 발달로 다양한 생물 중에서 유용 형질을 발현하는 생물체를 생산하는 연구가 이루어지고 있다. 최근에는 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9)과 같은 유전자 가위(site-directed nuclease, SDN)를 사용한 유전자 교정 기술(genome editing)의 등장으로 표적 유전자 부위만을 편집하는 일이 가능해졌다(Cong et al. 2013; Jinek et al. 2012). CRISPR/Cas9은 virus 감염에 대항하는 박테리아의 면역 시스템을 응용한 기술로, 표적 유전자 특이적인 서열을 갖고 있는 단일 가이드 RNA (Single guide RNA, sgRNA)가 DNA 절단효소(Cas9)를 표적 위치로 인도한다. Cas9이 protospacer adjacent motif (PAM) 서열 부근 이중가닥 DNA를 절단하면 세포 내 DNA 수복기전에 의해 잘린 부분이 복구된다. 이때 잘린 부분의 염기가 소실되거나 삽입되는 기전(Noh-homologous end joining, NHEJ)이 일어나 원래 DNA와는 다른 서열이 만들어진다. 이를 응용하여 유전자의 기능을 상실하게 만들거나, 손상된 유전자에 원하는 서열을 부가하여

S. J. Park · Y.-I. Choi · H. A. Jang · H. Lee · E.-K. Bae (✉)
국립산림과학원 산림생명자원연구부
(Department of Forest Bio-resources, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea)
e-mail: baek@korea.kr

S.-G. Kim
한국과학기술원 생명과학과
(Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon 34141, Korea)

H. Choi
국립산림과학원 산림바이오소재연구소
(Forest Biomaterials Research Center, National Institute of Forest Science, Jinju 52817, Korea)

B.-C. Kang
기초과학연구원 유전체 교정 연구단
(Center for Genome Engineering, Institute for Basic Science (IBS), Daejeon 34126, Korea)

유전자 기능을 복구할 수 있다(Ran et al. 2013).

전 세계적으로 유전자 교정 생물체에 대한 연구가 활발해지면서, 연구결과물의 생산 및 유통과 관련하여 유전자변형 생물체(Living modified organism; LMO)와 같이 규제를 적용할 것인지에 대한 논의가 진행되고 있다(Lee 2019; Schmidt et al. 2020). 이에 대한 관리체계를 구축하기 위해, 유전자 교정 기술로 생산된 생물체를 SDN-1, SDN-2, SDN-3로 분류하는 방법이 제시되었다(Hilscher et al. 2017). 이에 따르면, SDN-1은 운반체 DNA를 사용하지 않고 목표로 하는 유전체 서열 내에 하나 혹은 몇 개의 염기에 변이를 일으킨 경우이다. SDN-2는 운반체 DNA를 사용하여 하나 혹은 몇 개의 염기에 변이를 만든 경우이다. 그리고 SDN-3은 운반체 DNA를 사용하여 비교적 크기가 큰 DNA 가닥을 원하는 유전체 부위에 삽입하는 경우에 해당된다(Hilscher et al. 2017). 유럽사법재판소는 모든 class의 유전자 교정 생물체를 Biosafety Directives and Regulations (food/feed, env. release) (1990, 2001/2003 개정)에 근거하여 LMO로 간주하고, 같은 규제를 적용해야 한다고 판결하였다(Lee 2019). 반면 미국에서는 유전자 교정 생물체를 LMO로 간주하지 않는 가운데, 농무부(United States Department of Agriculture, USDA)의 최근 개정된 규정에 의거하여 규제 면제 청원 절차를 통해 규제 면제 대상 여부를 판정 받도록 하였다(USDA-APHIS 2020). 브라질, 아르헨티나, 칠레 등의 국가도 미국과 유사한 정책을 시행하고 있다. 일본, 호주에서는 새로운 유전자 도입 없이 유전자 교정이 이루어진 경우, 즉 SDN-1 class에 한해 LMO 규제 대상에서 제외로 두고 있다. 그러나 이를 제외한 나머지 기술로 만들어진 유전자 교정 생물체의 경우 안전성이 검증되지 않았다고 판단하여 규제 대상에 포함하고 있다. 한국에서도 유전자 교정 생물체 규제 방식 및 범위에 대한 논의가 활발히 이루어지고 있는 가운데, 안전성 문제를 해결하기 위해 외래 DNA를 생물체 안에 남기지 않는 유전자 교정 방법 개발에 관한 연구의 필요성이 대두되었다(Genetic Literacy Project 2020; Lee 2019; Park et al. 2019; Schmidt et al. 2020).

포플러는 성장속도가 빠르고 생산성이 높으며 환경적응성이 뛰어나 조림 수종으로 주로 사용되었다(Son 2009). 또한 유전체 서열이 알려져 있는 모델 수종이기도 하여, 포플러에 대한 다양한 연구가 진행되었다(Guo et al. 2012; Qiu et al. 2019; Tuskan et al. 2006). CRISPR/Cas9 유전자 교정 기술이 적용된 포플러 관련 연구는 아그로박테리움 튜머페이션스(*Agrobacterium tumefaciens*)을 이용하여 Cas9 및 sgRNA 서열을 운반체 DNA에 도입하여 진행되었다(Elorriaga et al. 2018; Fan et al. 2015; Muhr et al. 2018; Zhou et al. 2015). 이 도입 방법은 전통적인 LMO 제작 방법처럼 식물 염색체 안에 Cas9 및 sgRNA 서열이 보존되므로 LMO 규제 적용 및 안전성 논란이 있다. 이는 다른 임목과 작물에도 적용되기 때문에 Cas9 단백질과 sgRNA를 시험관에서 혼합하여 만든 리보핵산단백질을 직접 도입하는 방법이 개발되었고, 밀, 보리, 담

배, 양배추, 상추 및 고무나무 등에서 해당 교정 기술을 적용한 사례가 보고되었다(Fan et al. 2020; Kim et al. 2017; Liang et al. 2017; Liu et al. 2020; Malnoy et al. 2016; Murovec et al. 2018; Sant'Ana et al. 2020; Woo et al. 2015; Wu et al. 2020). 그러나 다른 나무와 달리 포플러에서는 아직 원형질체를 활용한 리보핵산단백질을 직접 도입하여 유전자를 교정한 연구 사례가 보고되지 않았다.

본 연구에서는 한국에 중요한 포플러 수종 중 하나인 현사시나무(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)를 대상으로 리보핵산단백질에 의한 염색체 DNA의 교정이 가능한지 확인하였다. 이전 연구에서 발현이 감소하였을 때, 내염성을 증진시키는 것으로 밝혀진 현사시나무의 STRESS-ASSOCIATED PROTEIN 1 (SAP1) 유전자(Yoon et al. 2018)를 표적으로 하여 원형질체에 도입한 리보핵산단백질에 의해 현사시나무의 유전자가 교정되는 것을 처음으로 밝혔다.

재료 및 방법

단일가닥 가이드 RNA (sgRNA) 설계 및 합성

현사시나무 (*Populus alba* × *Populus glandulosa*) Stress-Associated Protein 1 (*PagSAP1*) 서열을 표적으로 하는 단일가닥 가이드 RNA (sgRNA) 제작에는 CRISPR RGEN tool(한양대, 한국)의 Cas-Designer 웹페이지(<http://www.rgenome.net/cas-designer/>)를 사용하였다(Park et al. 2015). Cas9 효소는 *Streptococcus pyogenes* SpCas9의 5'-NGG-3'을 PAM type으로 선택하였다. 목표 유전체(Target genome)는 현사시나무에서 보고된 *Populus alba* × *Populus tremula* var. *glandulosa* (poplar 84k)를 선택하였다. 표적 서열(Target sequence)에 현사시나무 *SAP1* 유전자 서열(CX653572.1, Yoon et al. 2018)의 엑손 서열 513 base pair (bp)을 입력하였다. 그리고 sgRNA 길이는 PAM을 제외한 20 bp (base-pair)로 설정하였다. 선택한 sgRNA는 TGEN_aRS1 (ToolGen, 한국) 서비스와 Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit (Takara, 일본)을 사용하여 매뉴얼에 따라 합성 및 정제한 뒤 실험에 사용하였다.

In vitro cleavage assay

합성한 sgRNA가 Cas9과 같이 표적 서열을 절단할 수 있는지 확인하기 위해, 먼저 PowerPlant Pro DNA isolation kit (Qiagen, 독일)를 이용하여 현사시나무 잎에서 genomic DNA를 분리하였다. 표적 DNA 영역을 Guide-it™ Complete sgRNA Screening System (Takara, 일본)의 매뉴얼대로 *PagSAP1*-Forward (F) 와 *PagSAP1*-Reverse (R) 프라이머(Table 1)를 사용하여 증폭하였다. 0.5 µg Cas9과 1 µg sgRNA를 혼합한 뒤 5분 동안 37°C에서 배양한 후 0.25 µg PCR 산물을 첨가하고 37°C에서 30분,

Table 1 Sequences of primers used for amplification of the CRISPR target loci of the *stress associated protein 1* gene of hybrid poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*, *PagSAP1*)

Primer	Sequence (5'→3')
<i>PagSAP1</i> -F	GAACGGGTTGTGGTGTTC
<i>PagSAP1</i> -R	GAGCAGCAGTCCGATAATCAAAG
<i>PagSAP1</i> -sg1-F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGATTTCCTTGCAGGACTTTTG
<i>PagSAP1</i> -sg1-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCCTTGTGGCACTTGGAAAC
<i>PagSAP1</i> -sg2/3-F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGTGGCTTCTTTGGAAGTG
<i>PagSAP1</i> -sg2/3-R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACCAGCAACCACAGGTTTC

80°C에서 5분 동안 배양하였다. 표적 PCR 산물의 절단 분석을 위해 2% agarose gel에서 전기영동을 통해 band를 확인하였다.

현사시나무 잎에서 원형질체 추출

현사시나무에서 원형질체를 분리하기 위해, 6주간 기내배양한 현사시나무의 정단부를 잘라 MS 고형 배지(1/2× MS, 3% sucrose, 0.2 mg/L indole-3-butyric acid, 0.8% agar)를 담은 사각 tissue culture box에 넣어 4주간 배양하였다. 배양은 생장실에서 16시간 명 조건(150 μmol/m²s)과 8시간 암 조건으로 24±1°C에서 수행하였다. 정단부에서 2~3 번째 현사시나무 잎을 0.5~1 mm 간격으로 잘라서 효소 용액(0.4 M Mannitol, 3 mM MES, 1× CPW, 0.1 M CaCl₂, 0.1% BSA, 3% cellulase R-10, 0.8% macerozyme R-10, pH 5.6)에 띄우고, 호일로 밀봉한 뒤 암상태 조건에서 회전교반기의 속도를 30 rpm로 하여 4시간 동안 분해하였다. 분해된 현사시나무 잎과 효소 용액 혼합물은 항생제인 cefotaxime을 10 μg/ml 농도로 첨가한 동량의 W5 용액(154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, 1.5 mM MES, pH 5.6)으로 희석하였다. 상기 혼합물을 2번 여과한 후 round-bottom tube에 넣고 120×g의 속도로 5분 동안 원심분리하여 원형질체를 회수하였다. 재현탁된 원형질체를 21% sucrose 용액에 띄워 정제하고 120×g 속도로 5분 동안 원심분리하였다. 정제된 원형질체를 W5 용액으로 세척한 뒤 120×g 속도로 5분 동안 원심분리하여 침전시켰다. 마지막으로 원형질체를 W5 용액에 재현탁한 뒤 헤마사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 현미경(Leica DM IL LED, Leica, 독일)으로 세포수를 확인하였다.

현사시나무의 원형질체에 리보핵산단백질 도입

원형질체에서 현사시나무 *SAP1* 유전자를 교정하기 위해, 현사시나무 *SAP1* 유전자를 표적으로 하는 리보핵산단백질을 만들었다. 저장 완충액(10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol, pH 7.4)에 녹아 있는 Cas9 단백질(Enzymomics, 한국) 90 μg을 *PagSAP1* sgRNA 30 μg, 반응

완충 용액(20 mM HEPES-KOH, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 6.5)과 혼합하고 상온에서 30분 동안 배양하였다. 그리고 2×10⁵개의 현사시나무 원형질체를 200 μl MMG (4 mM MES, 0.4 M Mannitol, 15 mM MgCl₂, pH 5.6) 용액에 재현탁하였다. 미리 준비한 Cas9 단백질과 sgRNA 혼합액을 첨가한 뒤, 동일 부피의 새로 제조한 polyethylene glycol (PEG) 용액(40%[w/v] PEG 4000, 0.2 M mannitol, 0.1 M CaCl₂)과 혼합하고 상온에서 10분 동안 배양하였다. 배양 후 800 μl의 W5 용액을 첨가하고 상기 용액을 혼합하였다. 그 다음 1,000 rpm의 속도로 1분 동안 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤, 다시 1 ml의 W5 용액을 첨가하고 섞어서 세척하였다. 그리고 1,000 rpm의 속도로 1분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 1 ml의 MS 용액(1× MS[-NH₄OH], 1× Vitamin mix, 0.2 M Mannitol, 0.4 M Glucose, 2.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L 6-benzylaminopurine)에 재현탁하였다. 그리고 현탁한 원형질체를 24°C에서 72시간 동안 암배양하였다. 24시간 간격으로 300 μl씩 재현탁한 원형질체를 회수하여 유전체 교정 분석을 수행하였다. 한편 리보핵산단백질을 도입하지 않고 PEG 처리만 수행한 원형질체를 같이 배양하였다. 배양한 원형질체는 24시간 간격으로 재현탁한 뒤 300 μl씩 회수하여 0.5%(v/v) Evan's blue solution (0.25%[w/v] Evan's blue dye, 0.6 M Mannitol)로 염색하고 현미경(Leica DM IL LED, Leica, 독일)으로 관찰하였다. 상기 실험은 독립적으로 3번 수행하였다.

현사시나무 유전체 교정 분석

Cas9-sgRNA 리보핵산단백질을 도입한 현사시나무 원형질체로부터 유전체 교정 여부를 분석하기 위해 PowerPlant Pro DNA isolation kit (Qiagen, 독일)을 이용하여 genomic DNA (gDNA)을 분리하였다. 분리한 gDNA에서 표적 위치(on-target site)를 *PagSAP1*-F와 *PagSAP1*-R를 이용해 AmpONETM α-Taq DNA polymerase (GeneAll, 한국)로 매뉴얼에 따라 증폭하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동으로 확인한 후, *PagSAP1*-sgRNA1-F, *PagSAP1*-sgRNA1-R, *PagSAP1*-sgRNA2/3-F, *PagSAP1*-sgRNA2/3-R을 사용하여 인덱스와 시퀀싱 어댑터가 결합할 서열을 2차 PCR을 통해 부가하였다. 2차 PCR 산물은 1%

Table 2 Hybrid poplar protoplast yields with various concentrations of the cell-wall digestion enzymes from leaves (15–16 healthy leaves)

Enzyme concentration	Protoplast yield	Viability (%)
Cellulase R10-3%, Macerozyme R10-0.8%	4.8×10^6 protoplasts per gram	96
Cellulase R10-3%, Macerozyme R10-0.8%, Hemicellulase-1.2%	2.4×10^6 protoplasts per gram	95
Cellulase R10-3%, Macerozyme R10-1.0%, Hemicellulase-1.2%	2.3×10^6 protoplasts per gram	94
Cellulase R10-3%, Macerozyme R10-1.2%, Hemicellulase-1.8%	3.5×10^6 protoplasts per gram	93

현사시나무 잎에서 추출한 원형질체에 리보핵산단백질 도입

현사시나무 잎의 엽육세포에서 원형질체를 추출하여 리보핵산단백질을 도입하였다. 원형질체는 식물세포에서 세포벽을 제거한 것으로, 세포벽을 제거하기 위해 셀룰라아제 (cellulase), 펙티나아제 (pectinase), 자일라나아제 (xylanase), 헤미셀룰라아제 (hemicellulase) 등의 효소와 완충 용액을 혼합한 효소 용액을 사용한다 (Cove 1979; Park and Han 1986). 건강한 원형질체를 다량 얻기 위해, 기내배양한 현사시나무의 잎 15~16장에서 효소 용액을 구성하는 효소의 종류와 양을 달리하여 원형질체를 추출하고 그 양을 비교하였다. 효소 용액을 구성하는 효소의 양은 Park과 Han (1986) 및 Guo 등 (2012)이 기술한 결과를 토대로 일부 변형하여 사용하였다. 그 결과, 셀룰라아제 3%(w/v), 마세로자임(펙티나아제와 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제 혼합물) 0.8%(w/v)를 포함하는 조건에서 4.8×10^6 /g로 회수율이 가장 높았다 (Table 2). 반면, 같은 조건에서 헤미셀룰라아제 1.2%(w/v)를 첨가했을 때는 2.4×10^6 /g로 회수율이 감소하였고, 헤미셀룰라아제 농도가 같은 상황에서 마세로자임의 양만 늘렸을 때 회수율이 2.3×10^6 /g로 더 감소하였다. 그리고 마세로자임과 헤미셀룰라아제 농도가 모두 증가하였을 때는 회수율이 3.5×10^6 /g로 오히려 증가하는 것을 확인하였다. 효소 양이 증가하면 회수율도 증가하지만, 모든 조건에서 일치하지는 않았다. 포도와 사과에 대한 이전 연구에서 효소의 농도를 높였을 때 원형질체 회수율이 증가하지 않은 결과와 유사한 경향을 보였다 (Malnoy et al. 2016).

본 연구에서 얻은 결과는 Park과 Han (1986) 및 Park 등 (1990)이 기술한 기내배양 현사시나무의 엽육세포로부터 원형질체를 추출하는 방법에 비해 효소의 종류와 양을 줄이고, 배양 시간을 조절하였다. 이를 통해 효소 비용을 줄이고 원형질체 회수율은 유사하게 유지함으로써 현사시나무에서 원형질체를 얻는 방법을 개선하였다.

셀룰라아제 3%(w/v), 마세로자임 0.8%(w/v)를 녹인 효소 용액을 사용하여 원형질체를 추출하고 리보핵산단백질을 PEG 용액을 사용해 도입하였다. 리보핵산단백질은 90 μ g의 Cas9 단백질에 30 μ g의 sgRNA1, sgRNA2 또는 sgRNA3을 각각 첨가하여 혼합한 후 바로 원형질체에 도입하거나, 상온에서 30분 동안 배양한 후 도입하였다. 그 다음 PEG, 원형질체와 리보핵산단백질, PEG와 원형질체를 혼합하여 상온에

서 10분간 배양하였으며, W5 용액으로 세척한 후 MS 배지에 넣어 암배양하였다. 그리고 24시간 간격으로 일정량의 샘플을 채취하여 genomic DNA를 추출하였고, 리보핵산단백질을 도입하지 않고 PEG와 혼합하였던 원형질체도 같이 배양하면서 24시간 간격으로 상태를 관찰하였다. 그 결과, 시간이 지날수록 Evan's blue로 염색되는 원형질체의 비율이 증가하였으나 72시간 후에도 살아있는 원형질체가 높은 비율로 관찰되었다 (data not shown). 이와 같이 PEG에 의한 삼투압 변화에도 불구하고 계속 살아있는 원형질체의 비율이 높게 유지되는 것은 세포의 활력이 유지되고 있으며, 후에 재분화 유도를 통해 유전자 교정 식물체로 성장할 가능성이 있음을 의미한다 (Sant'Ana et al. 2020; Wu et al. 2020).

리보핵산단백질에 의한 유전체 교정을 분석

원형질체에 리보핵산단백질 도입 후 24시간 간격으로 일정량의 샘플을 채취하여 원형질체로부터 genomic DNA를 추출하고, 표적 유전자 부위에 대해 표적화된 딥시퀀싱 (targeted deep sequencing)을 이용하여 유전자 변이를 측정하였다. 상기 실험은 모두 독립적으로 3번 수행하여 결과를 비교하였다.

CRISPR/Cas9 리보핵산단백질 (Cas9-gRNA)의 도입 효율을 높이기 위해, Cas9 단백질과 sgRNA를 혼합한 후 상온에서 10~30분 가량 사전 반응 시간을 주는 방법이 보고된 바 있다 (Woo et al. 2015). 이를 참고하여 반응 시간(30분) 처리 유무에 따른 표적 유전자의 변이 빈도를 조사하였고, 배양 24시간째에 이를 확인하였다 (Fig. 2a, Supplementary Table 2). 그 결과, 30분간 사전 반응하여 형성한 CRISPR/Cas9 리보핵산단백질을 현사시나무 원형질체에 도입했을 때, sgRNA3의 경우는 표적 유전자의 변이 빈도가 평균 1.97%로 가장 높게 나타났다. 이에 반해 Cas9 단백질과 sgRNA를 혼합한 후, 사전 반응 시간을 거치지 않고 형성한 CRISPR/Cas9 리보핵산단백질을 현사시나무 원형질체에 도입한 경우는 표적 유전자의 변이 빈도가 평균 0.03%로 매우 낮게 나타났다. 따라서 Cas9 단백질과 가이드 RNA를 혼합한 후 일정 기간 배양하면 CRISPR/Cas9 리보핵산단백질이 안정화되어 변이 빈도를 증가시키는 것으로 추측되며 (Sant'Ana et al. 2020), 현사시나무에서도 동일한 결과가 나타났다. 한편 sgRNA1과 sgRNA2를 사용한 리보핵산단백질을 도입한 경우는 Cas9 단백질과 sgRNA를 혼합한 후 30분 동안 배양하여 사용하여도

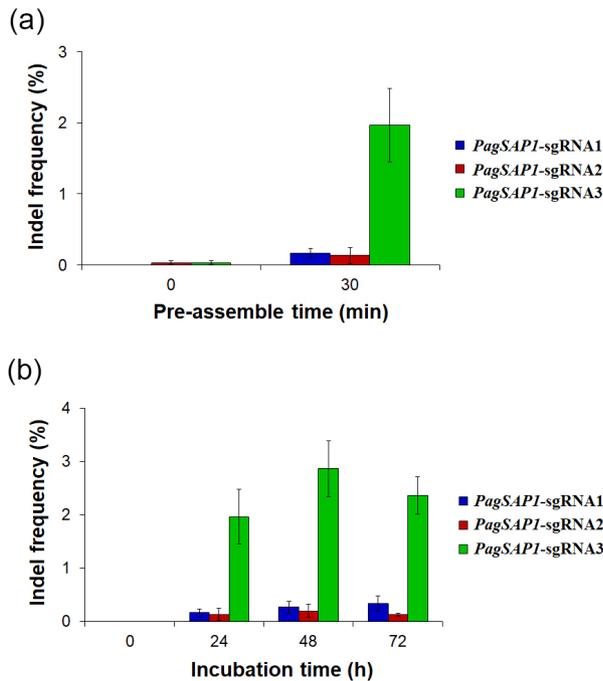


Fig. 2 Mutation rate assay by targeted deep sequencing of protoplasts of *PagSAPI*. Mutation frequencies of Cas9/sgRNA ribonucleoproteins (a) with different pre-assemble times and (b) at different incubation times. N=3

표적 유전자의 변이 빈도가 각각 0.17%, 0.13%로 현저히 낮게 나타났다(Fig. 2a). 이에 대하여 현재로서는 sgRNA 별로 나타나는 유전자 교정 효율의 차이가 명확히 규명되지는 않았으나, 염기 서열에 따른 GC 비율 변화 등 물리화학적 요소 및 다른 여러 요소가 Cas9 단백질과의 결합 안정성, 핵산 가수분해 효소에 의한 분해 등에 영향을 주어 차이가 발생하는 것으로 추측된다. 따라서 실제 프로그램에서 제공하는 후보군 중 여러 개의 sgRNA를 선정하고 실험을 통해 검증하는 것이 중요하다(Kim 2004; Moon et al. 2018).

CRISPR/Cas9 리보핵산단백질을 현사시나무 원형질체에 도입 후 배양 시간에 따른 표적 유전자 교정 효과(변이 빈도)를 확인하기 위해, 표적화 딥시퀀싱을 수행한 후 변이(insertion and deletion, indel)가 예상되는 위치, 즉 PAM 서열로부터 5' 방향 3 nt (nucleotide) 부근의 서열 변화를 조사하였다(Fig. 2b, Supplementary Table 2). 그 결과, sgRNA1 및 sgRNA2의 경우는 24~72 시간 배양에도 표적 유전자의 변이 빈도가 0.5% 미만으로 매우 낮게 나타났다(sgRNA1: 24시간 배양 시 0.17%, 48시간 배양 시 0.27%, 72시간 배양 시 0.3%; sgRNA2: 24시간 배양 시 0.13%, 48시간 배양 시 0.2%, 72시간 배양 시 0.13%). 반면, sgRNA3의 경우는 24시간 배양 시 1.97%, 48시간 배양 시 2.87%, 72시간 배양 시 2.37%의 빈도로 나타나는 것을 확인하였다(Supplementary Table 2). 종합해보면 배양 시간에 따라 표적 유전자 변이 빈도가 약 1.5배 증가하였고, 48시간



Fig. 3 Distribution of mutation patterns and their frequencies at three target sites of *PagSAPI* from protoplasts incubated for 72 hr. The three target sites were (a) *PagSAPI*-sgRNA1, (b) *PagSAPI*-sgRNA2, and (c) *PagSAPI*-sgRNA3. The blue letters denote the protospacer adjacent motif (PAM). Within the sequences, red letters indicate inserted nucleotides while the red dashes represent the deleted nucleotides. Numbers on the right represent the frequencies of each mutation pattern

이후에는 큰 차이가 없었다. 순무와 꽃양배추에서 진행된 연구에서는, 원형질체 배양 시간과 교정 효율 사이에 상관관계가 있는지 보기 위해 원형질체에 리보핵산단백질 도입 후 24시간, 72시간 배양하고 교정 효율을 분석하였는데, 24시간 배양한 원형질체 교정 효율은 4.89%, 72시간 배양한 원형질체의 경우 4.3% 정도 효율을 보여 배양 시간과 교정 효율 사이에 유의적인 차이가 없다고 하였다(Murovec et al. 2018). 상추, 바나나, 고무나무, 포도, 사과, 옥수수 등에서 진행된 다른 연구에서도 원형질체에 리보핵산단백질 도입 후 24시간 내지 48시간째 교정 효율 분석을 진행하였다(Fan et al. 2020; Malnoy et al. 2016; Sant'Ana et al. 2020; Woo et al. 2015; Wu et al. 2020). 따라서 현사시나무에서 여러 종류의 sgRNA에 대해 교정 효율을 확인할 때 리보핵산단백질 도입 후 원형질체를 48시간 동안 배양하여 분석하는 것이 적합하다고 판단된다.

리보핵산단백질 도입 후 배양 72시간째 원형질체에서 실제로 표적 유전자의 서열 변이 분포 양상을 확인하였다(Fig. 3).

각 sgRNA에 대해 나타난 서열 변이 양상을 보면, sgRNA3 리보핵산단백질 도입 시 변이는 PAM의 상류 3번째 위치에 1개 염기가 부가되거나 1~5개의 염기가 결손되었고, DNA 서열의 삽입이나 염기의 치환은 나타나지 않았다(Fig. 3c). 이러한 양상은 sgRNA1, sgRNA2 리보핵산단백질을 도입한 원형질체에서도 유사하게 나타났으나 빈도 수는 보다 적었다(Fig. 3a, b). 이와 같은 서열 변이는 단백질 암호화 영역의 frame shift나 조기 종결을 유도하여 현사시나무 SAP1 단백질의 기능을 억제할 것으로 예상된다. 유사한 결과가 리보핵산단백질을 사용한 밀과 고무나무 유전자 교정 연구에서 보고되었다(Fan et al. 2020; Liang et al. 2017).

상추에서 리보핵산단백질을 식물 세포에 도입하여 교정 효과를 확인하고 식물체를 얻었을 때, 교정 효율은 3.2~5.7%로 나타났고 재분화율은 0.5% 미만으로 극히 낮았으나, 그중 유전자 교정 식물체는 46% 빈도로 나타나 변이가 안정적으로 축적되어 높은 비율로 유전자 교정 식물체가 재생되었다(Woo et al. 2015). 본 연구를 토대로 현사시나무 원형질체 재분화를 유도하여 식물체를 얻으면 높은 확률로 표적 유전체가 교정된 현사시나무를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 종합해 보면, 본 연구에서 CRISPR 리보핵산단백질을 이용하여 외래 DNA의 삽입 없이 현사시나무에서 유전체 교정을 효과적으로 수행할 수 있음을 확인하였다. 현사시나무는 원형질체를 이용해 재분화 식물체를 얻은 결과들이 보고되어 있다(Park and Han 1986; Park and Son 1988). 이 결과를 이용하여 유전자가 교정된 원형질체로부터 재분화 식물체를 얻는 연구를 수행할 예정이다. 본 실험에서 확립된 유전체 교정 방법은 현사시나무의 내염성 향상 등 다양한 산림분야에서 요구되는 현사시나무 특질 개량에 LMO 규제를 받지 않으면서 효과적으로 적용될 가능성이 크고, 따라서 유용 형질을 갖는 수종의 생산 및 보급에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

CRISPR/Cas9에 의한 유전자 교정 기술은 유용 형질을 갖는 작물 및 임목의 육성에 있어 널리 사용되고 있는 핵심 기술이다. 유전자 교정 임목 육성에는 아그로박테리움에 의한 형질전환 방법이 높은 효율로 시행된 연구가 많았고 따라서 형질전환에 사용된 플라스미드 서열이 식물 유전체 안에 존재한다는 문제가 남아 있었다. 본 연구에서는 CRISPR/Cas9을 사용하여 유전자 교정 임목을 육성하는 데 기존에 알려진 벡터 도입 기술이 아닌, 단일 가이드 RNA (sgRNA)와 Cas9 단백질을 혼합하여 만든 리보핵산단백질을 현사시나무 원형질체에 도입하는 방법을 기술하였다. 염 스트레스 내성 관련 인자 *PagSAP1* 유전자를 표적으로 하는 3종류의 sgRNA를 디자인하고, 각 sgRNA와 Cas9 단백질을 혼합하여 만든 리보핵산단백질을 원형질체에 도입하였다. 표적화

시퀀싱을 통해 리보핵산단백질 형성 시 sgRNA와 Cas9 단백질을 혼합하고 일정 시간 배양하여 안정화되는 시간이 필요한 것을 확인하였다. 또한 sgRNA3의 리보핵산단백질이 sgRNA1, sgRNA2의 리보핵산단백질보다 높은 교정 효율을 보이는 것을 확인하였다. 본 실험을 통해 리보핵산단백질을 이용한 유전자 교정 기술이 임목에도 적용될 수 있음이 확인되었고, 이는 외래 유전자 없이 유전자 교정 임목을 육성하는 데 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 산림청 국립산림과학원 연구사업(세부과제명: 유전자가위를 이용한 임목 유전체 교정 기술 개발, 과제번호: FG0702-2018-01-2018)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819-823
- Cove DJ (1979) The uses of isolated protoplasts in plant genetics. *Heredity* 43:295-314
- Elorriaga E, Klocko AL, MA C, Strauss SH (2018) Variation in mutation spectra among CRISPR/Cas9 mutagenized poplars. *Front Plant Sci* 9:594
- Fan D, Liu T, Li C, Jiao B, Li S, Hou Y, Luo K (2015) Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep* 5:12217
- Fan Y, Xin S, Dai X, Yang X, Huang H, Hua Y (2020) Efficient genome editing of rubber tree (*hevea brasiliensis*) protoplasts using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Ind Crops Prod* 146:112146
- Genetic Literacy Project (2020) Human and agriculture gene editing: Regulations and index. Available online at: <https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org>
- Guo J, Morrell-Falvey JL, Labbé JL, Muchero W, Kallure UC, Tuskan GA, Chen J-G (2012) Highly efficient isolation of *Populus* mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays. *PLoS ONE* 7:e44908
- Hilscher J, Burstmayr H, Stoger E (2017) Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding. *Biotechnol J* 12:1-4
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821
- Kim H, Kim S-T, Ryu J, Kang B-C, Kim J-S, Kim S-G (2017) CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Comm* 8:14406
- Kim Y-S (2004) RNAi: A powerful reverse genetic tool. *J. Korean*

- Soc Endocrinol 19:109–119
- Lee S-W (2019) Current status on the modification of the scope for LMO regulation on the gene edited plants with no remnants of inserted foreign DNA fragments. *J Plant Biotechnol* 46: 137–142
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Comm* 8:14261
- Liu W, Rudis MR, Cheplick MH, Millwood RJ, Yang J-P, Ondzighi-Assoume CA, Montgomery GA, Burris KP, Mazaremi M, Chesnut JD, Stewart CN Jr. (2020) Lipofection-mediated genome editing using DNA-free delivery of the Cas9/gRNA ribonucleoprotein into plant cells. *Plant Cell Rep* 39:245–257
- Malnoy M, Viola R, Jung M, Koo O, Kim S, Kim J-S, Velasco R, Kanchiswamy CM (2016) DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci* 7:1904
- Moon SB, Lee JM, Kang JG, Lee N-E, Ha D-I, Kim DY, Kim SH, Yoo K, Kim D, Ko J-H, Kim Y-S (2018) Highly efficient genome editing by CRISPR-Cpf1 using CRISPR RNA with a uridinylate-rich 3'-overhang. *Nat Comm* 9:3651
- Muhr M, Paulat M, Awwanah M, Brinkkötter M, Teichmann T (2018) CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Populus BRANCHED1* and *BRANCHED2* orthologs reveals a major function in bud outgrowth control. *Tree Physiol*. 38:1588–1597
- Murovec J, Gucek K, Bohanec B, Avbelj M, Jerala R (2018) DNA-free genome editing of *Brassica oleracea* and *B. rapa* protoplasts using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Front Plant Sci* 9:1594
- Park J, Bae S, Kim J-S (2015) Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics* 31: 4014–4016
- Park J, Kim K, Kim J-S, Bae S (2017) Cas-Analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics* 33:286–288
- Park S-C, Hwang Y-H, Kim K-M, Kim J-K, Koh H-J (2019) Gene-edited crops: present status and their future. *Korean J Breed Sci* 51:175–183
- Park Y-G, Choi M-S, Kim J-H (1990) Plant regeneration of *Populus glandulosa* from mesophyll protoplast. *Korean J Plant Tissue Culture* 17:189–199
- Park Y-G, Han KH (1986) Isolation and culture of mesophyll protoplasts from in vitro cultured *Populus alba* × *P. glandulosa*. *J Korean Soc For* 73:33–42
- Park Y-G, Son SH (1988) Culture and regeneration of *Populus alba* × *glandulosa* leaf protoplasts isolated from in vitro cultured explant. *J Korean Soc For* 77:206–215
- Qiu D, Bai S, Ma J, Zhang L, Shao F, Zhang K, Yang Y, Sun T, Juang J, Zhou Y, Galbraith DW, Wang Z, Sun G (2019) The genome of *Poplar alba* × *Populus tremula* var. *glandulosa* clone 84K. *DNA Res* 26:423–431
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8:2281–2308
- Sant'Ana RRA, Caprestano CA, Nodari RO, Agapito-Tenfen SZ (2020) PEG-delivered CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins system for gene-editing screening of maize protoplasts. *Genes* 11:1029
- Schmidt SM, Belisle M, Frommer WB (2020) The evolving landscape around genome editing in agriculture. *EMBO reports* 21:e50680
- Son Y (2009) From science area to politic area; Development and distribution of Eunsuwonsasi tree. *The Korean J Hist Sci.* 31:437–474
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313 (5793), 1596–1604. <https://doi.org/10.1126/science.1128691>
- USDA-AHPIS (2020) The SECURE rule. Available online at: <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/biotech-rule-revision/secure-rule>
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim J-S (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotech* 33:1162–1164
- Wu S, Zhu H, Liu J, Yang Q, Shao X, Bi F, Hu C, Huo H, Chen K, Yi G (2020) Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana. *BMC Plant Biol* 20:425
- Yoon S-K, Bae E-K, Lee H, Choi Y-I, Han M, Choi H, Kang K-S, Park E-J (2018) Downregulation of stress-associated protein 1 (*PagSAP1*) increases salt stress tolerance in poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*). *Trees* 32:823–833
- Zhou X, Jacobs TB, Xue L-J, Harding SA, Tsai C-J (2015) Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol* 208:298–301

Supplementary Table 1 List of sgRNAs designed to target *PagSAP1*

Target gene	Target sequence (5'→3') with PAM	Position	Out-of-frame Score	Mismatch		
				0	1	2
<i>PagSAP1</i>	GACTGGATGCCAAGCTCCAG AGG * ^{sg1}	18	73.2	2	2	0
	ACTGGATGCCAAGCTCCAG AGG	19	71.5	2	2	0
	GGATGGGGCCCTCTGGAGCT TGG	27	68.2	1	3	2
	ATGCAGAGGATGGGGCCCT TGG	34	73.6	3	1	0
	GTTGGGCTTGTGCTGGTTC AGG	126	73.2	2	0	0
	CTGCCAGTTGGGCTTGTGCT TGG * ^{sg2}	132	72.1	2	0	0
	AATGGATGATGCTGCCAGTT GGG	143	75.0	2	0	1
	CAATGGATGATGCTGCCAGTT TGG * ^{sg3}	144	77.1	2	0	0
	TCCATTCACAATGCTTCAAT TGG	161	70.4	2	0	3
	TTCTGAGATGAAGGCAAAT GAGG	297	68.4	1	3	0
	TCTGAGATGAAGGCAAAT GAGG	298	68.1	1	3	0
	AGGCAAATGAGGGACCCAGT AGG	308	78.0	1	1	2
	ACCGCTTGCCGAAAGCGTGT TGG	334	68.1	2	2	0
	ACCAACACGCTTTCGGCAAG CGG	335	74.3	4	0	0
	AACGATGAATTGCACAGAAC AGG	387	71.2	2	0	2

* indicates the single-guide RNAs selected for editing of *PagSAP1* with Cas9. PAM is indicated by bold letters.

Supplementary Table 2 Mutation rate assay by targeted deep sequencing of protoplasts of *PagSAP1* with different pre-assemble time of Cas9/sgRNA ribonucleoproteins and at different incubation times

Sample name	Pre-assemble time	Incubation time	Number of Reads (more than minimum frequency)			Number of Insertion mutations			Number of deletion mutations			Indel ratio (average, %)
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<i>PagSAP1</i> -sgRNA1	0 min	24 h	39389	35741	26905	7	0	0	7	0	0	0
		48 h	29122	33106	32967	0	7	0	0	23	0	0.03
		72 h	26996	36725	24769	0	0	0	2	2	0	0
	30 min	24 h	45157	45585	50476	90	82	0	34	12	4	0.17
		48 h	42518	37878	34213	151	76	0	37	72	0	0.27
		72 h	43776	41305	36494	132	185	0	26	54	2	0.33
<i>PagSAP1</i> -sgRNA2	0 min	24 h	30576	20844	37021	5	15	0	4	7	2	0.03
		48 h	26453	23702	29629	0	0	0	4	0	0	0
		72 h	29014	28591	23729	0	19	0	0	23	0	0.03
	30 min	24 h	35111	23032	36567	10	50	0	3	48	2	0.13
		48 h	20200	48581	33103	16	179	0	9	75	0	0.2
		72 h	20691	31725	51577	15	33	50	7	8	32	0.13
<i>PagSAP1</i> -sgRNA3	0 min	24 h	30644	78640	32866	0	66	0	3	19	3	0.03
		48 h	17916	52942	34182	0	33	344	0	3	331	0.7
		72 h	17314	34769	27002	0	30	330	0	34	184	0.7
	30 min	24 h	51640	45115	45960	430	496	1455	155	228	0	1.97
		48 h	23986	25262	31323	300	608	1144	75	235	3	2.87
		72 h	17336	32473	55491	187	760	972	73	135	583	2.37